

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

(11) N° de publication :  
(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

2 750 221

(21) N° d'enregistrement national : 96 07840

(51) Int Cl<sup>6</sup> : G 02 B 7/04, G 02 B 21/00

(12)

## DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

(22) Date de dépôt : 25.06.96.

(30) Priorité :

(71) Demandeur(s) : LEMAIRE CHRISTIAN — FR.

(72) Inventeur(s) :

(43) Date de la mise à disposition du public de la  
demande : 26.12.97 Bulletin 97/52.

(56) Liste des documents cités dans le rapport de  
recherche préliminaire : Ce dernier n'a pas été  
établi à la date de publication de la demande.

(60) Références à d'autres documents nationaux  
apparentés :

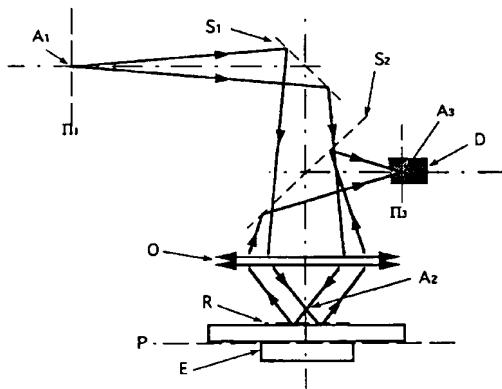
(73) Titulaire(s) :

(74) Mandataire :

### (54) DISPOSITIF DE CARACTERISATION DE MISE AU POINT DE MICROSCOPE OPTIQUE.

(57) L'invention concerne un dispositif permettant de caractériser la mise au point d'un microscope optique en utilisant la réflexion d'un faisceau lumineux sur une surface R solidaire de l'échantillon à observer E.

Le faisceau lumineux, issu d'un point A<sub>1</sub>, est injecté dans le microscope par un séparateur S<sub>1</sub>. Il est réfracté par l'objectif O, est réfléchi par la surface R, est à nouveau réfracté par l'objectif O avant de se focaliser au point A<sub>3</sub> dont la position dépend de la distance échantillon/objectif. Un détecteur D renseigne sur la position de A<sub>3</sub>. Lorsque la mise au point n'est pas réalisée, la distance échantillon/objectif n'est pas nominale. Le détecteur génère alors un signal permettant la correction de cette distance.



FR 2 750 221 - A1



Le réglage de mise au point d'un microscope optique est généralement fait manuellement, même si le microscope est équipé d'un appareil de prise de vues ou d'une caméra. Pour des observations immédiates lorsque l'utilisateur doit rester à proximité du microscope, cette nécessité de réglage manuel ne constitue généralement pas un problème majeur. 5 Cependant, de plus en plus souvent, des observations microscopiques s'intègrent dans des processus automatisés. C'est le cas par exemple pour les examens et comptages bactériologiques sur échantillons multiples, et pour le suivi de cultures cellulaires nécessitant des examens à intervalles de temps réguliers. Il est nécessaire de refaire périodiquement le réglage de la mise au point du microscope, soit suite à un déplacement 10 ou un changement de l'échantillon, soit simplement pour compenser les dérives des structures mécaniques. Un réglage simplement manuel est tout à fait inadapté à ce genre de situations.

Certains dispositifs ont été imaginés pour rendre automatiques ces réglages de mise au point. Ces systèmes se composent essentiellement d'une partie détection qui permet de 15 dire si la mise au point est réalisée, et d'une partie actionneur qui agit mécaniquement sur le réglage du microscope au cas où la mise au point doit être retouchée. Le fonctionnement de la partie détection repose généralement sur l'analyse de l'image fournie par le microscope, cette image étant saisie par une caméra et traitée par logiciel. La critère de mise au point est basé sur l'optimisation du contraste ou des hautes fréquences spatiales 20 de l'image. Ce mode de caractérisation de la mise au point est directement inspiré de la démarche humaine de l'utilisateur qui règle le microscope en fonction de l'image qu'il observe.

Régler la mise au point d'un microscope consiste à placer le plan d'observation  $P$ , défini par la construction du microscope, dans le plan de l'échantillon qui intéresse l'observateur. 25 Un tel réglage revient donc à placer le plan de l'échantillon à examiner à une distance bien définie du plan principal objet de l'objectif.

La présente invention concerne un dispositif de caractérisation de mise au point destiné à être intégré dans un microscope optique. Un faisceau lumineux issu de l'objectif du microscope se réfléchit sur une surface solidaire de l'échantillon. Cette réflexion permet 30 d'ajuster la distance surface réfléchissante/objectif, donc la distance échantillon/objectif c'est à dire la distance de mise au point. La surface réfléchissante peut être de toute nature. Il peut s'agir par exemple de la surface de l'échantillon elle même, ou d'une surface de lamelle couvre-objet ou porte-objet dans le cas d'observation d'objets biologiques.

Le schéma général est porté sur la figure 1. Un faisceau, qui peut être visible ou 35 infrarouge est issu d'un point lumineux  $A_1$  situé sur l'axe optique dans un plan  $\Pi_1$  perpendiculaire à cet axe. Ce point lumineux  $A_1$  peut être matérialisé par le trou très fin

d'un diaphragme ou par le point de focalisation d'un faisceau lumineux. Ce faisceau peut en particulier être un faisceau laser. Dans un mode particulier de réalisation, on peut considérer le plan  $\Pi_1$  rejeté à l'infini. Dans ce cas le faisceau lumineux sera un faisceau collimaté. Ce faisceau lumineux pourra être visible ou infrarouge.

5 Ce faisceau est introduit dans le tube du microscope au moyen d'un séparateur de faisceau  $S_1$  et est réfracté par l'objectif du microscope O. Il converge en un point  $A_2$ . Après réflexion sur la surface réfléchissante R solidaire de l'échantillon E, ce faisceau est à nouveau réfracté par l'objectif. Après réflexion sur un séparateur  $S_2$  il est focalisé en un point  $A_3$ . La position de ce point  $A_3$  dépend des positions relatives des divers éléments 10 optiques réfléchissant ou réfractant le faisceau. Elle dépend en particulier de la position de la surface réfléchissante R par rapport à l'objectif du microscope. Quand la mise au point est correcte, le point  $A_3$  se trouve dans un plan  $\Pi_3$  perpendiculaire à l'axe optique du système; c'est ce qui définit la position du plan  $\Pi_3$ .

La surface réfléchissante R étant solidaire de l'échantillon, un défaut de mise au point se 15 traduit par une modification du chemin optique suivi par le faisceau. Dans ce cas le point de convergence  $A_3$  se trouve hors du plan  $\Pi_3$ .

Un détecteur de position de foyer D renseigne sur la position du point  $A_3$  par rapport au plan  $\Pi_3$ . La position de ce détecteur est définie de sorte que lorsque la mise au point est correcte, c'est à dire le point  $A_3$  dans le plan  $\Pi_3$  le détecteur génère un signal constituant 20 une référence. Lorsque la mise au point n'est pas correcte, le point  $A_3$  ne se trouve pas dans le plan  $\Pi_3$ . Dans ce cas, le détecteur génère un signal, autre que le signal de référence et qui renseigne sur la position de  $A_3$ .

Ce signal engendre alors une action de correction de la mise au point.

Divers types de détecteurs de position de foyer D ont été imaginés. On peut citer en 25 particulier le dispositif à couteau présenté en figure 2. Un couteau (C) est placé dans le plan  $\Pi_3$  et délimite deux demi-espaces dont la frontière coupe l'axe optique du système. Un détecteur deux cadrans Q est placé derrière le couteau, la ligne de séparation des deux cadrans étant parallèle à la bordure du couteau. Si le point  $A_3$  se trouve dans le plan  $\Pi_3$  juste sur la lame du couteau. Les deux cadrans du détecteur Q sont également éclairés 30 (figure 2a). Le signal issu du détecteur constitue alors le signal de référence. Par contre, si le point  $A_3$  ne se trouve pas dans le plan  $\Pi_3$  un seul des cadrans est éclairé. Cet éclairage différentiel est à l'origine d'un signal autre que le signal de référence et qui agit sur le réglage de la mise au point (figures 2b et 2c).

Les positions relatives de  $\Pi_1$  et  $\Pi_3$  sont telles que lorsque la mise au point est correcte, ils sont conjugués optiques. N'importe quel couple de plans vérifiant cette condition peut être choisi.

Il peut néanmoins être judicieux de choisir ces plans conjugués optiques avec la surface 5 réfléchissante R par l'objectif du microscope. Dans une telle configuration, un défaut d'orientation de la surface réfléchissante ne déportera pas le point  $A_3$  hors de l'axe optique. Ceci facilite généralement la détection.

Des composants optiques additionnels peuvent être placés sur le chemin optique du faisceau afin de placer les plans  $\Pi_1$  et  $\Pi_3$  dans des positions accessibles. Considérons par 10 exemple le cas d'un microscope avec image intermédiaire à l'infini. Si, comme dans le cas de la figure 3, la surface réfléchissante R est confondue avec le plan de l'objet à examiner (ce qui est généralement vrai pour les observations biologiques, la surface réfléchissante étant le dioptre de la lamelle de verre en contact avec l'échantillon), placer  $\Pi_1$  et  $\Pi_3$  dans des plan conjugués de la surface réfléchissante signifie les placer à l'infini, ou, ce qui est 15 équivalent du point de vue optique, dans les plans focaux d'optiques convergentes  $L_1$  et  $L_3$ .

Les avantages de ce dispositif de caractérisation et de réglage de mise au point par rapport aux systèmes passant par une analyse d'images sont nombreux. On peut citer entre autres :

- la rapidité,
- 20 - la simplicité de réalisation (en particulier dans le cas de l'utilisation d'un laser comme faisceau lumineux,
- la possibilité de faire une mise au point même sans image visible. Ceci est particulièrement intéressant en microscopie de fluorescence sur des objets très peu lumineux et pour lesquels les images sont enregistrés par un film photographique ou 25 une caméra à intégration mettant en jeu des temps de pose importants.

## REVENDICATIONS

- 1) Dispositif de caractérisation de mise au point de microscope optique caractérisé en ce qu'un faisceau lumineux est réfléchi sur une surface R solidaire de l'échantillon à examiner E et est conduit vers un détecteur D qui permet de connaître la position relative 5 de la surface réfléchissante par rapport à l'objectif du microscope afin de la corriger au moyen d'un système de déplacement.
- 2) Dispositif selon la revendication 1 caractérisé en ce qu'après la réflexion sur la surface R le faisceau lumineux est focalisé en un point A<sub>3</sub> dont la position dépend de celle de R , le détecteur D étant sensible à la position de ce point A<sub>3</sub> .
- 10 3) Dispositif selon la revendication 1 caractérisé en ce qu'un faisceau lumineux est injecté dans le chemin optique du microscope au moyen d'un séparateur de faisceau.
- 4) Dispositif selon les revendications 1 à 3 caractérisé en ce que le faisceau lumineux est issu d'un laser.
- 5) Dispositif selon une quelconque des revendications précédentes caractérisé en ce 15 que le faisceau lumineux est un faisceau infrarouge.
- 6) Dispositif selon les revendications 1 et 2 caractérisé en ce que la surface réfléchissante R est constituée par une face de la lamelle porte-objet ou couvre-objet en contact avec l'échantillon.
- 7) Dispositif selon une quelconque des revendications précédentes caractérisé en ce 20 que le détecteur D est sensible à la position du point de focalisation de faisceau.

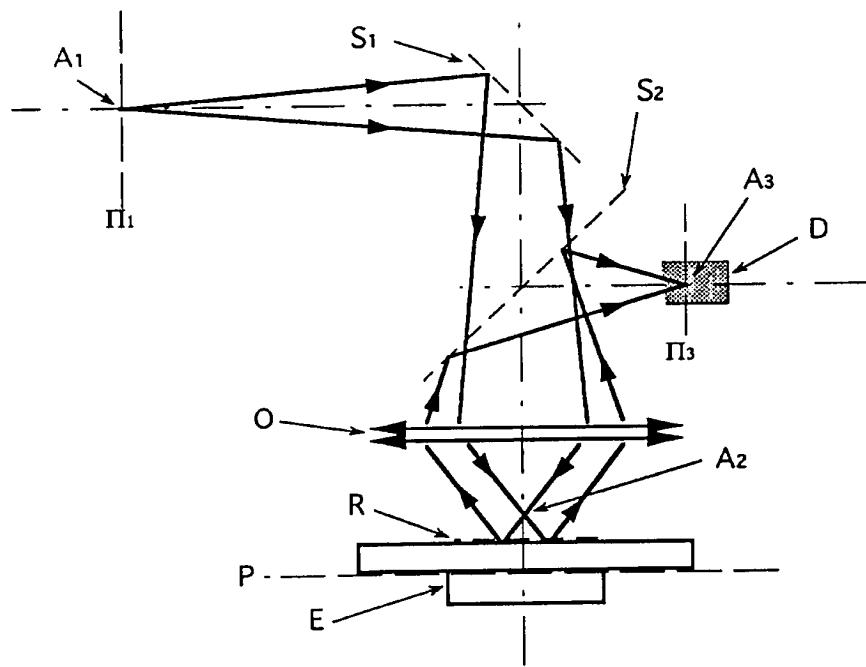


FIG. 1

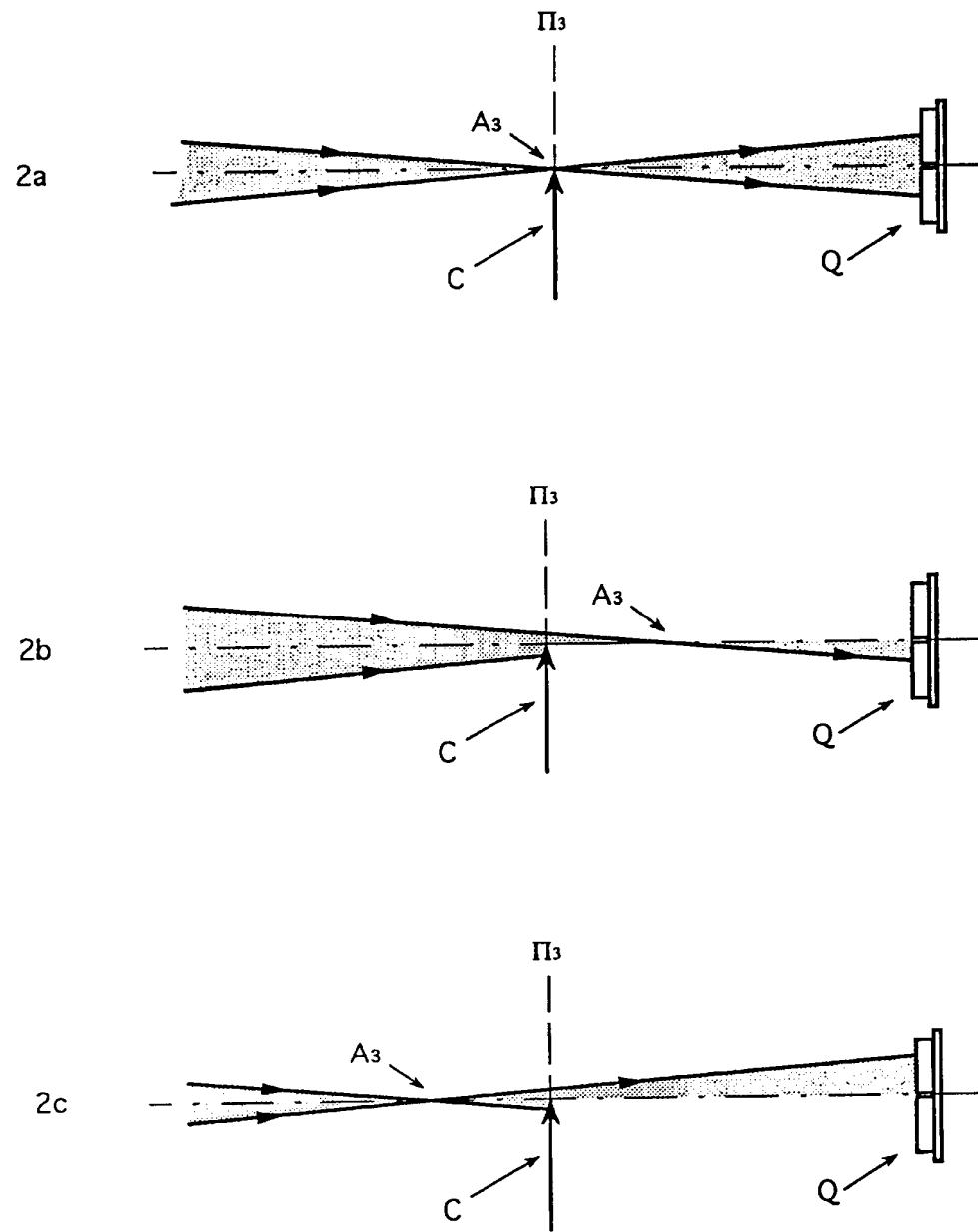


FIG. 2

3/3

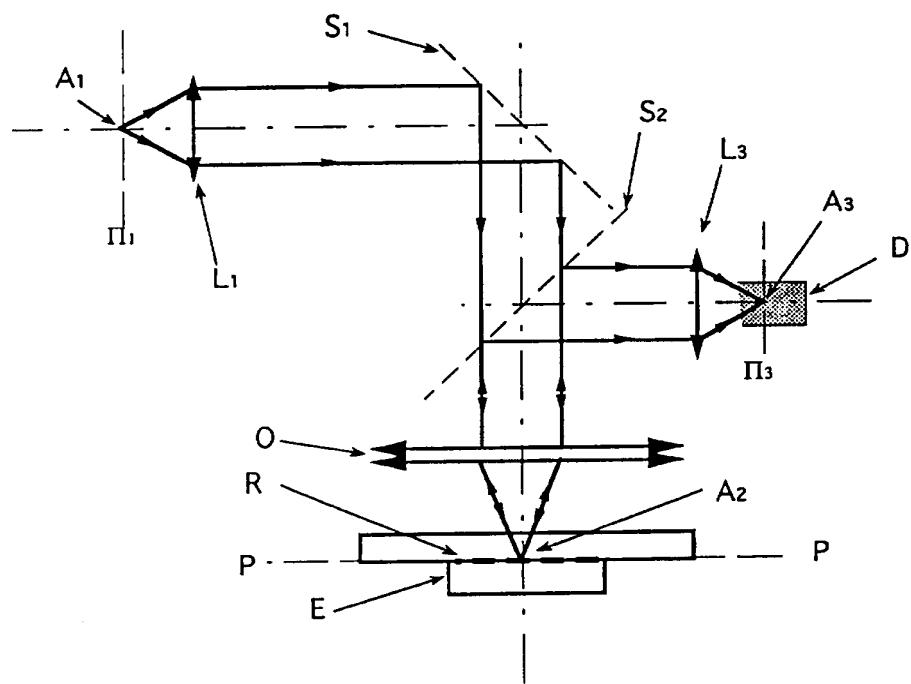


FIG.1